Mem. Inst. Butantan
24(2):101-110, Out.° 1952

TÉCNICA DE PERFUSÃO PARA A COLETA DE *SCHISTOSOMA MANSONI* EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO

POR JOSÉ M. RUIZ

(*Secção de Parasitologia, Instituto Butantan, S. Paulo, Brasil.*)

A coleta de helmintos assume aspectos técnicos variáveis de acôrdo com a localização dos parasitas no hospedeiro. Para os Schistosomídeos em geral as técnicas correntes utilizadas nas necrópsias rotineiras não dão bons resultados. A localização dos delicados vermes no interior dos finos vasos sanguíneos constitui um obstáculo ao encontro e retirada dos mesmos.

Nos estudos de Schistosomose experimental a coleta total dos vermes é de primacial importância, principalmente para a avaliação da ação terapêutica das drogas. Para a produção de antígenos é igualmente importante a obtenção do maior número possivel de vermes.

Já está fora de época o processo de remoção individual .dos Schistosoma, do fígado ou dos pulmões, dilacerando e esmiuçando os órgãos, ou dos plexos mesentéricos por idêntico processo, rasgando a estilete os finos vasos.

Semelhante processo, além de moroso e cansativo, dificultado ainda pela coagulação do sangue, não permite a remoção total dos vermes, além de fragmentar grande número deles. Não serve portanto como método de controles terapêuticos, de estudo das formas em evolução ou em trânsito, ou em fase de crescimento, nem mesmo se adapta á coleta em massa de adultos para a produção de antigenos específicos.

O método de perfusão é o único que pode permitir a retirada total dos vermes sem que estes se fragmentam ou se alterem. O princípio do método consiste em:

1 — Isolar os órgãos ou regiões a serem examinados, mediante ligaduras em determinados pontos do sistema circulatório.

2 — Perfundir os vasos nos quais se encontram os vermes, provocando uma corrente liquida desde os capilares até os troncos venosos maiores.

A padronização de um processo com esta finalidade virá facilitar grandemente a marcha dos estudos experimentais.

Grande número de schistosomídeos permanece ainda desconhecido, na forma adulta ou num dos sexos, o que não aconteceria talvez se nas necrópsias rotineiras

fossem perfundidas as veias do sistema porta. Talvez com esse procedimento fossem evidenciados novos hospedeiros definitivos dos *Schistosoma* humanos, disseminadores eventuais da parasitose. Seria, por exemplo, muito oportuno um exame pormenorizado nesse sentido, principalmente dos roedores capturados em zonas de schistosomose endêmica.

Processos de perfusão: — Yolles e col. (1947) publicaram uma técnica modificando o antigo método preconizado por Faust e Meleney (1924).

Outra técnica foi publicada anteriormente por Brandt e Finch (1946) a qual nos parece pouco prática. Mais recentemente Pan e Hunter (1951) deram á publicidade nova técnica de perfusão que, como a de Yolles e col. é accessível e prática. Quando tivemos conhecimento do trabalho destes últimos autores estavamos utilizando um processo semelhante n'alguns aspectos.

Quando á aparelhagem e ás soluções usadas, introduzimos certas inovações que oferecem várias vantagens.

Yolles e col. utilizam para a perfusão salina citratada (0,75% citrato de sodio e 0,85% cloreto de sodio), para impedir a coagulação do sangue. Pan e Hunter usam uma simples solução fisiológica a 0,85%. A operação nos processos citados é continua, isto é, consiste num jato contínuo das soluções.

Em nossa rotina temos usado uma solução citratada mais fraca para impedir no maximo alterações dos vermes (Citrato de sodio 0,35% — Cloreto de sodio 0,75% em agua distilada). Além disso, nosso aparelho permite uma alternância de líquidos, de modo que depois de uma primeira fase de injeção do liquido citratado, continua-se a perfusão com solução fisiológica comum, a 0,85 ou 0,90%, fechando uma torneira e abrindo outra, sem tocar no órgão em exame.

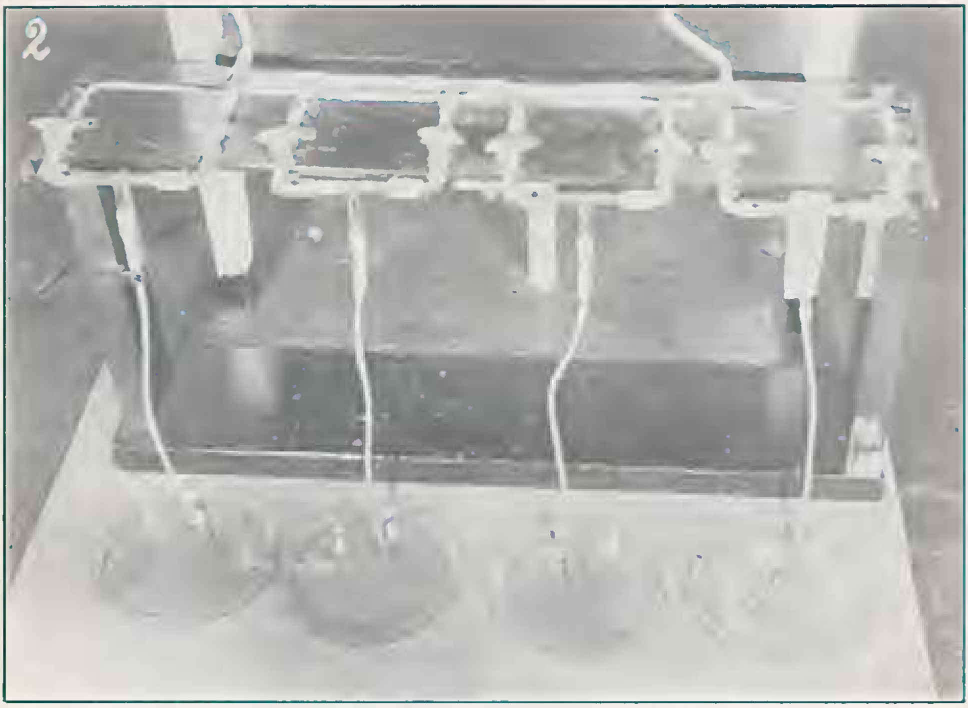
Outra inovação que nos parece realmente prática consiste em utilizar, como força propulsora do líquido, o seu próprio peso, colocando em altura adequada, o recipiente que o contem.

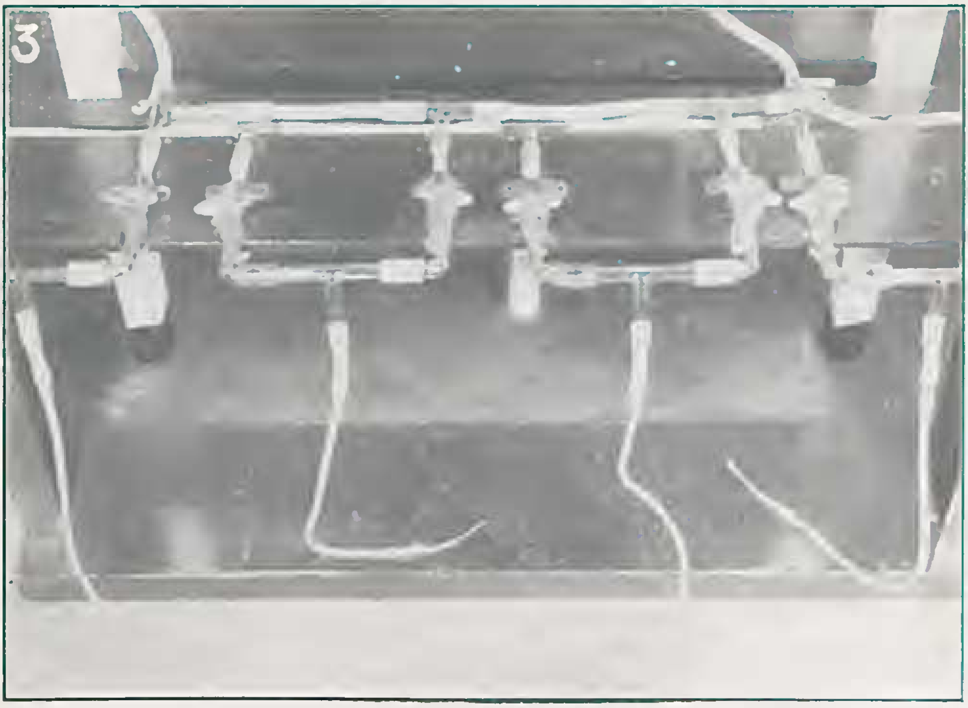
O aparelho de Yolles e col. requer um motor propulsor de ar e o de Pan e Hunter uma seringa de 100cc — num conjunto semelhante ao usado para transfusões sanguineas.

Aparelho: — As fotografias, 1 — 3, dispensam uma descrição detalhada. Dois boiões de 5 litros contêm respectivamente solução citrada e solução fisiológica comum e são colocados a uma altura de 1,20 m (nessa altura a corrente de líquido conduzida, através de uma cânula de 0,75 mm de abertura, é igual a mais ou menos 30 a 40ml por minuto). Na parte inferior do boião está adaptado um tubo em L (ou torneira) ao qual se liga um tubo de borracha que conduz o liquido ao aparelho. Cada cânula de perfusão se comunica com duas torneiras por meio de um tubo de vidro em T. Cada torneira recebe o

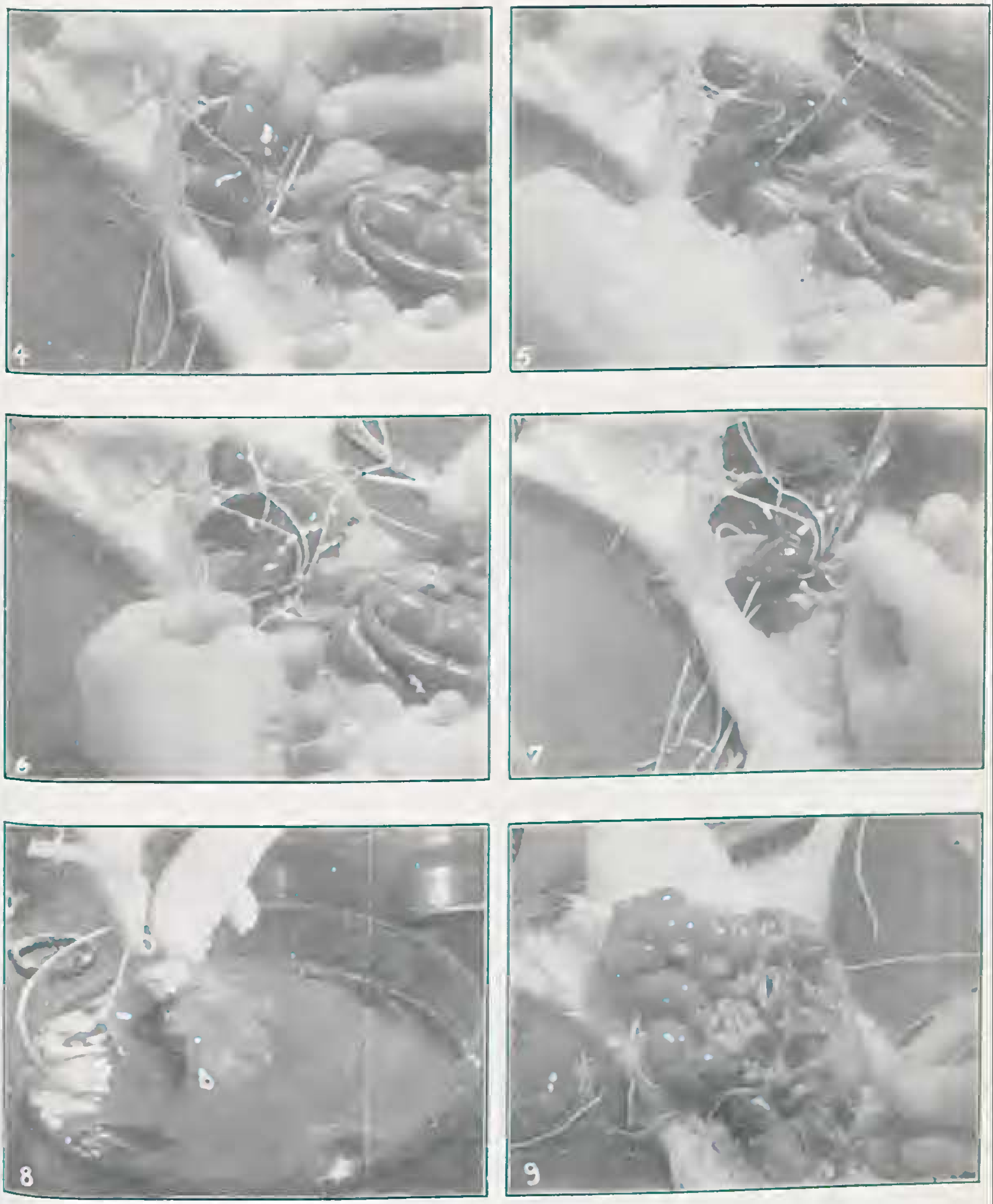
FIG. 1

Conjunto da aparelhagem para perfusão com alternancia de liquidos





FIGS. 2-3
Detalhes do aparelho de perfusão, mostrando o sistema de distribuição dos liquidos



FIGS. 4-9
Alguns detalhes técnicos sobre o isolamento do sistema porta, para perfusão

liquido de um dos boiões. O conjunto de cânulas pode variar de acôrdo com as necessidades. Quatro nos parece um número suficiente para trabalhar continuamente. No conjunto se adaptam, ao tubo central distribuidor de cada boião, as torneiras respectivas por meio de tubos em T.

As torneiras de um boião devem ser dispostas sempre no mesmo lado (direito ou esquerdo) para haver homogeneidade no trabalho. Será interessante marcar as torneiras do mesmo liquido com uma cruz ou usando tubos de borracha de outra côr nas articulações. É óbvio que ao usar um dos liquidos a torneira oposta deverá permanecer fechada. Com essa disposição pode-se perfundir à vontade com um ou outro liquido a qualquer momento. Esse conjunto se apoia numa plataforma de 75cm de comprimento por 20cm de largura na qual podem ser feitos encaixes para a adaptação dos tubos, que são fixados por meio de prendedores metálicos ou de arame. A plataforma deve ficar a uma altura de 25 a 30 cms da base. Sob a plataforma será útil adaptar duas lâmpadas elétricas para iluminação durante o trabalho. As cânulas devem ser adaptadas em tubos de borracha delgados e muito flexiveis. Não achamos interessante o uso de agulhas de injeção para este fim; as cânulas de vidro são amarradas com mais firmeza, podem ter uma curvatura adequada e as pontas arredondadas evitam a perfuração dos vasos.

O diâmetro das cânulas varia com o tipo de órgão a perfundir ou com o animal utilizado e para a cobaia devem ter um diâmetro externo de 1mm a 1,5mm.

Técnica:

1 — Sacrificar o animal com eter.

2 — Expôr os órgãos toráxicos e abdominais mediante incisão ampla pelos lados do ventre e do torax.

3 — Isolar o figado e região do mesentério por meio de ligaduras, como segue:

Figado:

a) ligadura dupla da veia cava acima do diafrágma.

b) ligadura dupla da veia cava inferior entre o figado e o rim direito (muita cautela) (Fig. 5).

c) ligadura dupla da veia porta o mais próximo possivel do figado (Figs. 4-6).

d) ligadura simples do esôfago próximo ao estômago.

f) retirar o figado, cortando os ligamentos, canal colédoco e o diafragma; êste deve ser cortado rente das paredes do corpo.

e) cortar as veias entre as ligaduras *a*, *b* e *c* e acima de *d* (Fig. 7).

g) colocar o figado numa placa de Petri grande (15cm); introduzir a cânula no *sinus hepáticus* e amarrar fortemente (Fig. 8).

h) retirar a ligadura da veia porta, puxando o fio longo que ficou e abrir a torneira da sol. citratada.

i) quando o figado esbranquiçar (1 ou 2 minutos), fechar a torneira e abrir a outra continuando a perfundir até encher 3 placas de Petri.

Os vermes são separados por decantação.

Mesentério:

a) ligadura simples da aorta uns 2 cm acima do diafrágma, cortando acima da mesma e destacando-a da coluna vertebral cerca de 1 cm.

b) cortar a coluna vertebral a cerca de 1 cm. acima do diafrágma.

c) ligar o reto cortado atrás, destacando-o até a altura da base das ilíacas, sem cortar as ramificações venosas.

d) ligar a aorta abdominal em conjunto com cava inferior na altura da base das iliacas (Fig. 9).

e) cortar a coluna vertebral um pouco abaixo da ligadura *d*.

f) retirar o conjunto compreendido entre os dois cortes da coluna vertebral, destacando previamente a pele.

g) colocar o conjunto numa placa de Petri ou cristalizador razo. Introduzir a cânula na aorta, previamente incisada e ligar firme.

h) abrir a torneira da sol. citratada e retirar a ligadura da veia porta.

i) encher a 1.ª placa e trocar de liquido, perfundindo um total de 4 placas.

É necessário auxiliar a perfusão distendendo e mudando a posição das dobras mesentéricas e dos vários órgãos.

Após a perfusão o conjunto é lavado em agua de torneira num frasco de capacidade de 500 ou 1000 ml. Tomar especial atenção na pesquisa dos vermes que podem ficar retidos entre as pregas e dobras dos plexos desde o estômago até a extremidade do grosso intestino.

Exame complementar: Depois da perfusão, se a coleta dos helmintos fôr necessariamente rigorosa, é preciso um exame complementar, tanto do figado como do mesentério.

O fígado é dilacerado ao longo das veias maiores, numa placa de Petri, sobre fundo preto, com o auxílio de 2 estiletes, depois é esmiuçado em solução fisiológica, recolhendo-se os vermes remanecentes (raros ou ausentes).

O mesentério deve ser observado minuciosamente do duodeno ao reto, examinando todas as ramificações sistematicamente, sobre fundo metade branco metade preto e sob luz forte. Uma lupa é suficiente para tal exame, aliás feito sem dificuldades a olho nú. Os machos se destacam no fundo preto ao passo que as fêmeas se evidenciam no fundo branco, aparecendo como finos riscos escuros, devido ao conteúdo intestinal e aos vitelinos.

Tabela dando o número de S. mansoni *coletados por perfusão e pelo exame complementar, para avaliação da eficiência do método.*

Exame n.º	*Cobaia n.º*	*FIGADO* Perf.	Compl.	Eficiência da perf. %	*MESENTÉRIO* Perf.	Compl.	Eficiência da perf. %
81	1	30	2	93,7	39	0	100,0
82	2	(49)	?	—	59	0	100,0
83	3	20	4	80,0	16	1	94,1
94	4	57	3	95,0	94	5	94,9
95	5	15	0	100,0	62	5	92,5
99	6	139	18	87,9	268	52	83,7
107	7	66	0	100,0	176	11	94,1
108	8	21	3	87,5	43	8	84,3
111	9	4	0	100,0	24	5	82,8
113	10	84	0	100,0	15	8	65,2
114	11	28	0	100,0	44	1	97,7
118	12	6	0	100,0	2	4	33,3
120	13	37	1	97,3	53	4	92,9
123	14	(29)	?	—	35	3	92,1
132	15	(181)	?	—	32	0	100,0
134	16	15	0	100,0	21	0	100,0
136	17	5	0	100,0	6	0	100,0
137	18	4	0	100,0	15	0	100,0
138	19	—	—	—	104	2	98,1
140	20	3	0	100,0	22	2	90,1
145	21	17	4	80,9	55	2	96,5
147	22	7	0	100,0	26	1	96,2
156	23	12	3	75 %	91	2	97,8
161	24	14	0	100,0	55	0	100,0
167	25	0	0	—	5	0	100,0
172	26	32	0	100,0	76	20	79,1
176	27	39	5	100,0	23	0	100,0
178	28	11	0	100,0	21	4	81,0
179	29	5	0	100,0	62	13	80,1
180	30	5	0	100,0	11	0	100,0
181	31	15	0	100,0	33	4	87,9
182	32	2	0	100,0	51	2	96,0
183	33	4	0	100,0	28	2	92,9
184	34	9	0	100,0	66	0	100,0
185	35	26	0	100,0	—	—	—
TOTAL	35	732	43	94,84	1.733	161	91,05 %

Tempo necessario: O trabalho pode ser feito por uma só pessoa.

Desde a abertura do animal até a separação dos helmintos e respectiva contagem, gasta-se cêrca de uma hora.

Os exames complementares do fígado e mesentério exigem cêrca de 30 minutos.

Eficiencia do método: Importante é saber-se da eficiência do método sob dados concretos. Os autores citados que trabalharam no assunto não forneceram tais informes.

Consideramos *eficiência do metodo* a percentagem de vermes coletados pela perfusão sem exame complementar; pode ser considerado de eficiência praticamente absoluta nas mãos de técnico suficientemente apto.

Os dados que apresentamos representam a nossa primeira manipulação no assunto, sujeitos portanto a melhoria á medida que a técnica se aprimoriza. As perfusões assinaladas na tabela, nem todas foram executadas com pleno êxito, tendo havido algumas pequenas falhas de técnica.

A tabela não se refere a perfusões feitas em condições técnicas 100%. Sempre que a eficiência se mostrou abaixo de 90% houve falhas no decurso das manipulações.

RESUMO

1 — É descrita uma técnica de perfusão para a coleta de *Schistosoma mansoni* em cobáias experimentalmente infestadas.

2 — É utilizado novo aparelho para perfusão com alternância de liquidos.

3 — Recomenda-se a prática da perfusão nas necrópsias rotineiras de animais, para a verificação de infestações por schistosomideos em geral. Tal procedimento poderá redundar no encontro de possiveis portadores e disseminadores das schistosomoses humanas.

SUMMARY

1 — A perfusion technique for collecting *Schistosoma mansoni* from experimental infected Guinea-pigs is described.

2 — A new apparatus with alternative perfusion liquids is used for this purpose.

3 — Perfusion is recommended in routine necropsias of animals for verifying general infestations of Schistosomatids. Possibly this new procedure will help to discover probable hosts from human *Schistosoma* species.

BIBLIOGRAFIA

1. *Brandt, J. L. & Finch, E. P.* — Method for removal of adult S. *mansoni* from rabbits, *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, **61**: 22-23, 1946.
2. *Pan, C. & Hunter III, G. W.* — A modified perfusion technique for the recovery of schistosomes, *J. Lab. Clin. Med.*, **37**: 815-816, 1951.
3. *Yolles, T. K., Moore, D. V., De Giusti, D. L., Ripsom, C. A. & Meleney, H. E.* — A technique for the perfusion of animals for the recovery of schistosomes, *J. Parasitol.*, **33**: 419-426, 1947.